

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-177898

(43)Date of publication of application : 10.07.1990

(51)Int.Cl.

C12P 21/08
C12N 5/20
// A61K 39/395
C12N 15/06
G01N 33/569
G01N 33/577
(C12P 21/08
C12R 1:91)

(21)Application number : 63-331740

(71)Applicant : NAGASE SANGYO KK

(22)Date of filing : 28.12.1988

(72)Inventor : NAGAMUNE HIDEAKI
OTA FUSAO

(54) MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFICALLY REACTIVE WITH STREPTOCOCCUS MUTANS

(57)Abstract:

NEW MATERIAL:A monoclonal antibody specifically reactive with Streptococcus mutans (serum type c/e/f).

USE: Diagnosis, prevention and therepeutic agent for dental caries.

PREPARATION: For example, SE 17 strain, Streptococcus mutans serum type f, is put to culture in a medium, and the resulting bacteria is recovered and suspended into a phosphoric acid-buffered physiological saline solution followed by treatment in boiling water for 20min to effect sterilization. The resultant dead bacteria suspension is then injected into the abdomen of a BALB/C mouse to effect immunization. After the final immunization, spleen cells are collected and fused with mouse myeloma cells followed by making a culture in a HAT medium into a hybridoma, which is then screened and put to cloning by e.g. critical dilution method. The resulting monoclonal hybridoma is put to culture to obtain the objective monoclonal antibody.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報(A)

平2-177898

⑤Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	⑬公開 平成2年(1990)7月10日
C 12 P 21/08		8214-4B	
C 12 N 5/20			
// A 61 K 39/395	ADZ R	8829-4C	
C 12 N 15/06			
G 01 N 33/569	C	7906-2G	
(C 12 P 21/08	B	7906-2G	
C 12 R 1:91)			
		8515-4B C 12 N 5/00	B
		8717-4B 15/00	C
審査請求 未請求 請求項の数 2 (全8頁)			

⑭発明の名称 ストレプトコッカス・ミュータンスに特異的に反応するモノクローナル抗体

⑯特 願 昭63-331740

⑰出 願 昭63(1988)12月28日

⑱発 明 者 長 宗 秀 明 徳島県徳島市南庄町3丁目24番地 第2小川ビル43号
 ⑱発 明 者 太 田 房 雄 徳島県徳島市中島田町3丁目23-10番地
 ⑲出 願 人 長瀬産業株式会社 大阪府大阪市西区新町1丁目1番17号
 ⑳代 理 人 弁理士 青 山 葆 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

ストレプトコッカス・ミュータンスに特異的に反応するモノクローナル抗体

2. 特許請求の範囲

1. ストレプトコッカス・ミュータンス(血清型c/e/f)に特異的に反応するモノクローナル抗体。

2. 請求項1記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、ストレプトコッカス・ミュータンス(*Streptococcus mutans*)(血清型c/e/f)に特異的に反応するモノクローナル抗体、および該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関する。

従来技術

ストレプトコッカス・ミュータンスは、う蝕(虫歯)の主たる原因菌として注目されている。スト

レプトコッカス・ミュータンスは健康人の歯面から採取したブラークからは、その23%からしか分離されないが、う蝕部位からは100%に分離されるという報告がある。また、ストレプトコッカス・ミュータンスが存在する比率と、う蝕の発生頻度(DMFS)とが比例するという事も報告されている。さらに、健康な歯面にう蝕が起こるまでの経過を時間的に追って調べると、う蝕が発生する前にはその部位にストレプトコッカス・ミュータンスが増加するという事も知られている。

ストレプトコッカス・ミュータンスはその血清型によりa~hに至る8つの型に分類されているが、近年、DNAの相同性に基づきストレプトコッカス・クリセタス(a型)、ストレプトコッカス・ラタス(b型)、ストレプトコッカス・ミュータンス(c/e/f型)、ストレプトコッカス・ソブリヌス(d/g型)、ストレプトコッカス・ダウネアイ(h型)に再分類することが提唱され、承認されている。このような分類に基づく、a型およびb型は齲歯類および稀にヒトから分離され、h型

はサルから頻りに分離され、c/e/f型のストレプトコッカス・ミュータンスはヒトから高率に分離され、その分離率は90%にも及ぶことが知られている。さらに、この血清型分類に従った各菌種とそう蝕発生の様子を比較すると、ストレプトコッカス・ミュータンス(c/e/f型)は主として歯の溝部にう蝕を発生させるのに対し、ストレプトコッカス・ソプリヌス(d/g型)は平面部のう蝕をも多発させるという、種間の差による発生部位の特異性も示されている[例えば、教養歯科基礎医学シリーズ「臨床家のための口腔微生物学」、廣森健志郎、株式会社書林(1986年)、および「歯の健康と食生活」、浜田茂幸編、第一出版株式会社(1986年)を参照]。

以上のような報告から、近年の分類学的見地からいうと、う蝕の多くはストレプトコッカス・ミュータンス(c/e/f型)に起因し、ストレプトコッカス・ミュータンスがう蝕の発生に関与する最も重要な病原菌であると考えられる。

このように、ヒトの主たるう蝕原因菌であるス

トレプトコッカス・ミュータンス(c/e/f型)に特異的に反応するモノクローナル抗体を作成することは、ヒトにおけるう蝕の診断、予防、および治療に極めて有用であり、現在までに、いくつかその作成が試みられている。例えば、Lehnerらはストレプトコッカス・ミュータンス(c型)のすべての菌に反応し、ストレプトコッカス・ミュータンス(e/f型)には弱く反応するモノクローナル抗体を得ている[Infect. Immun. 46, 168 (1984); Infect. Immun. 55, 810 (1987)]。

発明の目的

本発明者はヒトの主たるう蝕原因菌であるストレプトコッカス・ミュータンス(c/e/f型)に反応するモノクローナル抗体の作製を試みていたが、これまでに得られたモノクローナル抗体はストレプトコッカス・ミュータンス(c/e/f型)に完全に特異的なものではなく、他の口腔内ストレプトコッカス属の種と交差反応を示すものであった。そこで、さらに検討を進め、ストレプトコッカス・ミュータンス(c/e/f型)のみに反応し、

他の口腔内ストレプトコッカス属には反応しない、特異性の極めて高いモノクローナル抗体の作成を試み、それに成功した。即ち、本発明は、血清型c/e/fのストレプトコッカス・ミュータンスとは反応するが、他の口腔内ストレプトコッカス属とは反応しないモノクローナル抗体、および該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供するものである。

発明の構成および効果

本発明に係るモノクローナル抗体、および該抗体を産生するハイブリドーマは、以下のようにして製造することができる：即ち、

i) ストレプトコッカス・ミュータンスの菌体を抗原としてマウスを免疫し、

ii) 該マウスの抗体産生細胞とマウスのミエロマ細胞とを融合させ、血清型c/e/fのストレプトコッカス・ミュータンスとは反応するが、他の口腔内ストレプトコッカス属とは反応しないモノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマを選択し、

iii) 該ハイブリドーマを適当な条件下で培養し、該モノクローナル抗体を回収する。

工程i)のマウスの免疫は、血清型c、e、またはfのストレプトコッカス・ミュータンスの菌体を抗原としてマウスに投与し、一定期間経過後さらに同一の抗原でマウスを処理することによって行うことができる。血清型fのストレプトコッカス・ミュータンス、例えばSE17株を用いるのが好ましい。通常、この菌体はFreundの完全アジュバントと混合してマウスに投与する。また、リン酸緩衝化生理食塩水に懸濁させて投与してもよい。

免疫するマウスとしては、例えばBALB/cマウスを用いるのが好ましい。

工程ii)の細胞融合は、工程i)で免疫されたマウスの抗体産生細胞とマウスのミエロマ細胞とを用い、常法によって行うことができる。

抗体産生細胞としては、上記BALB/cマウスの脾細胞が最も好ましいが、これ以外に、例えば、マウスのリンパ節細胞や末梢リンパ球なども

使用することができる。

ミエローマ細胞としては、マウスのミエローマ細胞株 SP2/O-Ag14 が好ましいが、P3-NS1-1-Ag4-1 や P3-X63-Ag8-U1 などの細胞株も用いることができる。

細胞融合法としては、ポリエチレングリコール法、H V J 法、電気融合法などを挙げることができる。

また、得られたハイブリドーマの選択は、例えば、以下のようにして行うことができる。即ち、ハイブリドーマを適当な培地で培養し、その培養液とストレプトコッカス・ミュータンス(血清型 c、e、および f) およびその他のストレプトコッカス属と反応させ、例えば酵素抗体法(BIA)によってストレプトコッカス・ミュータンス(血清型 c、e、および f) とのみ反応する抗体を産生しているハイブリドーマを選択すればよい。次いで、選択したハイブリドーマを限界希釈法によってクローニングする。

工程 iii) のモノクローナル抗体の回収は、例え

ば、工程 ii) で得られたクローンをマウスの腹腔内に移植した後、その腹水液から常法によって行うことができるし、大量培養装置を用いてハイブリドーマクローンを培養した培養液からも常法どおり回収することができる。また、回収した抗体を、硫酸塩析、分子ふるい、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等によって精製してもよい。

後記実施例に示すように、本発明のモノクローナル抗体は、血清型 c、e、および f のストレプトコッカス・ミュータンスとは反応するが、その他の口腔内ストレプトコッカス属、ストレプトコッカス・クリセタス(*Streptococcus cricetus*)、ストレプトコッカス・ラタス(*Streptococcus rattus*)、ストレプトコッカス・ソブリヌス(*Streptococcus sobrinus*)、ストレプトコッカス・ダウネアイ(*Streptococcus downei*)、ストレプトコッカス・フィラス(*Streptococcus ferus*)、ストレプトコッカス・ミティス(*Streptococcus mitis*)、ストレプトコッカス・サリバリウス(*Streptococcus*

-7-

us salivarius)、およびストレプトコッカス・サングイス(*Streptococcus sanguis*)とは反応しない。従って、本モノクローナル抗体は、ヒトにおけるう蝕の診断、予防、および治療に極めて有用である。

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例

(1) 抗原の調製

ストレプトコッカス・ミュータンス 血清型 f である SE17 株をブレイン・ハート・インフュージョン(以下、BHI と略称する)液体培地に接種し、37℃で18時間培養した。培養した菌体を回収し、リン酸緩衝化生理食塩水(以下、PBS と略称する)により3回遠心洗浄してから、菌体をその2倍容量の PBS に懸濁した。この菌液を沸騰水中で20分間処理した後、PBS で2度洗浄した。得られた死菌体を PBS に懸濁して、660nm の濁度が1.0 になるように菌液を調製

し、これを抗原液として用いた。

(2) マウスの免疫

上記抗原液と Freund 完全アジュバントの各々等量を混和して乳状液(water-in-oil 状)とした。この乳状液を BALB/c マウス(8週齢; ♀)に1ml/匹で腹腔内投与して免疫し、その4週後から1週毎に、0.5ml の抗原液/匹で12回反復して免疫を行った。免疫したマウスから血清を少量採取し、後述の酵素抗体法(以下、BIA と略称する)により血清中の抗体価を測定した。抗体価がエンドポイント測定法で20万倍以上を示したマウスにつき、前述の最終腹腔内免疫が終了して1週間後に再び前述の抗原液0.5ml を尾静脈中に投与し、その4日後に脾臓を摘出して細胞融合に供した。

(3) ハイブリドーマの調製

BALB/c マウス由来のミエローマ細胞 SP2/O-Ag14 株を10%仔牛血清(以下、FCS と略称する)を含むダルベッコ変法イーグル培地(以下、DMEM 培地と略称する)中で培養し、

-8-

生存率が90%以上の状態で回収し、その細胞をDMEM培地で2回洗浄した後、再びDMEM培地に懸濁してミエローマ細胞浮遊液とした。この液中の生細胞密度を血球計算盤を用いるトリパンブルー排除試験にて測定した。

免疫マウスから脾臓を摘出して、DMEMで3回洗浄後、これを細切して、新たな10mlのDMEM培地中でピンセットを用いて圧縮することにより分散させ単個細胞浮遊液とした。結合組織や細胞凝集塊を静置して除き、この単個脾細胞を遠心して回収した。次いで、この細胞を5mlの0.83%塩化アンモニウム溶液中に懸濁して氷冷下に10分間放置し、混入する赤血球を破壊した。これに5mlのDMEM培地を加えて遠心し、得られた沈降細胞を8mlのDMEM培地に懸濁して脾細胞浮遊液とした。脾細胞浮遊液中の生存細胞数を前記のトリパンブルー排除試験法で測定すると $2.5 \sim 3.0 \times 10^6$ 個/匹であった。各々のマウスから得られた脾細胞浮遊液に、その生細胞数の1/10数のミエローマを含むミエローマ細胞

浮遊液を混和し、全細胞を遠心して回収した。上清を除き、細胞を室温に戻してから、1mlの50%ポリエチレングリコール(DMEM培地中)(以下、PEGと略称する)を1~2分かけて徐々に添加して細胞と混和した。次に10mlのDMEM培地を5分間に渡って徐々に加え、PEGを希釈した後、遠心して細胞を回収した。得られた融合細胞に、10mlの20%FCS、100μMヒポキサンチン、16μMチミジンを含むDMEM培地(以下、HT培地と略称する)を加えて遠心し、洗浄した。この細胞を新たなHT培地中に 2.5×10^6 脾細胞/mlとなるよう懸濁して、Corning社製96穴カルチャープレートに100μl/穴となるように分注した。37℃、5%CO₂の存在下で6時間培養した後、各穴に100μlの800nMアミノプテリンを含むHT培地を加え、培養液を400nMアミノプテリンを含むHT培地(以下、HAT選択培地と略称する)とした。その後、このHAT選択培地中で10~14日間、5%CO₂存在下に37℃で培養し、ハイブリド

-11-

マ・コロニーを形成させた。

(4) 酵素抗体法(EIA)による抗体価の測定
ストレプトコッカス・ミュートンズ SE17株をBHI液体培地に接種し、37℃で18時間培養した後、PBSで3回遠心洗浄して菌体を得た。これをPBSに再び懸濁して660nmの濁度が0.6となるよう調整し、この菌液をNunc社製96穴イムプレートIIに50μl/穴となるよう分注し、37℃にて一夜乾固させて抗原固定化プレートとした。このプレートに1%牛血清アルブミンを含むPBS(以下、BSA-PBSと略称する)を300μl/穴で分注し、37℃で30分間放置することにより非特異的吸着効果を低減させた。BSA-PBSをPBSで洗浄後、ハイブリドマ培養上清、希釈した腹水上清、あるいは希釈した抗SE17株-マウス抗血清を50μl/穴で分注し、37℃で1時間反応させた。これをPBSで洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識化した抗マウス(IgG+IgM)-ヤギIgGのBSA-PBS希釈液を50μl/穴で分注し、

-12-

37℃で30分間反応させた。これをPBSで洗浄後、2,2'-アジノージー[3-エチルーベンゾチアゾリン-(6)-スルホン酸]と過酸化水素を含む基質液(Kirkegaard and Perry Laboratories社製)を50μl/穴で分注して、生じる発色の強度を414nmにおいて分光光度計で測定した。抗体結合量と吸光度が比例関係を持つ時間域において得られた結果を比較して抗体価の指標とした。

モノクローナル抗体の菌種あるいは血清型特異性を判定するため、上記のSE17株以外に下記の菌株も抗原として用いた。即ち、ミュートンズ群連鎖球菌として、

ストレプトコッカス・クリセウス: HS1株、E49株、HS6株;

ストレプトコッカス・ラクス: FA1株、BH T株、KAY1株;

ストレプトコッカス・ミュートンズ: Ingbritt株、MT6R株、LM7株、P4株、MT703R株、OMZ175株、MT557株;

ストレプトコッカス・ソブリヌス: OMZ17

6株、MT615R株、B13株、OMZ65株、6715株、K1R株；

ストレプトコッカス・ダウネアイ：MF25株、BFe12株、M4-49株；

ストレプトコッカス・フィラス：8S1株、HD3株；

ならびに、他の口腔内連鎖球菌として、

ストレプトコッカス・ミティス：ATCC9811株、ATCC15909株、ATCC15910株、ATCC15913株；

ストレプトコッカス・サリバリウス：HHT株、HT9R株；

ストレプトコッカス・サングイス：MT株、ST6株、ATCC10556株、ATCC10557株である。

(5) ストレプトコッカス・ミュータンス 血清型c、e、およびfに特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのクローニング

コロニーを形成した培養穴から50μlずつ上

清を分取し、SE17株を抗原として上記(4)に示したEIAにて抗SE17株抗体の有無を検討した。EIA陽性の培養穴中のコロニーを24穴カルチャープレート(Runc社製)に移して培養を続けた後、各々についてHT培地中に10細胞/mlとなるよう希釈分散し、96穴カルチャープレートに100μl/穴となるように分注した。5%CO₂の存在下、37℃で10~14日間インキュベートした後、コロニー形成穴の培養上清を50μl分取して、再びSE17株を抗原として上記(4)のEIAを行ない抗SE17株抗体の有無を調べた。EIA陽性で単一コロニーを生じた培養穴から、そのコロニーを24穴カルチャープレートに移して培養し、上記と同様の限界希釈法によって再度2回クローニングを行った。上記(4)に示した全ての菌株を抗原に用いて、最終クローニングの培養上清に含まれているモノクローナル抗体の抗原特異性を調べた。ストレプトコッカス・ミュータンス Ingbritt株、MT6R株(以上、血清型c)；LM7株、P4株、MT703R株(以

上、血清型e)；SE17株、OMZ175株、MT557株(以上、血清型f)のみに反応する抗体を分泌するハイブリドーマを、ストレプトコッカス・ミュータンス(血清型c、e、f)に特異的なモノクローナル抗体を分泌するマウスハイブリドーマf89株として樹立した(第1図)。

このマウスハイブリドーマf89株(このハイブリドーマクローンが産生するモノクローナル抗体はMAbf89と命名)は、微生物菌寄第10464号(FERM P-10464)として寄託されている。

(8) モノクローナル抗体MAbf89の免疫グロブリンクラスの同定

マウスハイブリドーマf89の培養上清を分取し、サンドイッチEIA法を原理とするマウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット(Amersham社製)を用いて樹立ハイブリドーマクローンにより産生されるモノクローナル抗体MAbf89のアイソタイピングを行った。同キットはマウスIgA、IgM、IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、Ig

G₃、およびκ、λ鎖を同定する。これによると、モノクローナル抗体MAbf89のクラスはIgG_{2a}であり、そのL鎖はκ型であった。

(7) マウス腹水中での抗体産生

BALB/cマウス(8~10週齢)に0.5mlのプリスタン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン)/匹を腹腔内投与した。その10日後に、あらかじめ10%FCSを含むDMEM培地で培養しておいたハイブリドーマf89を2.0×10⁷/匹として同マウスの腹腔内に接種した。接種して10~20日後、マウスが死亡する直前に、腹水を採取し、遠心して腹水上清を得た。Ingbritt株を抗原とし、上記(4)に示したEIAにより、得られた腹水上清の抗体価を調べた。同時にハイブリドーマf89の培養上清、およびそれを凍干分画して10倍濃縮したものについても同様に抗体価測定を行い、これらを比較した(第2図)。得られた腹水上清は培養上清の約260倍、濃縮培養上清の約30倍の抗体価を持ち、MAbf89の大量精製材料として適することが判明し

た。

4. 図面の簡単な説明

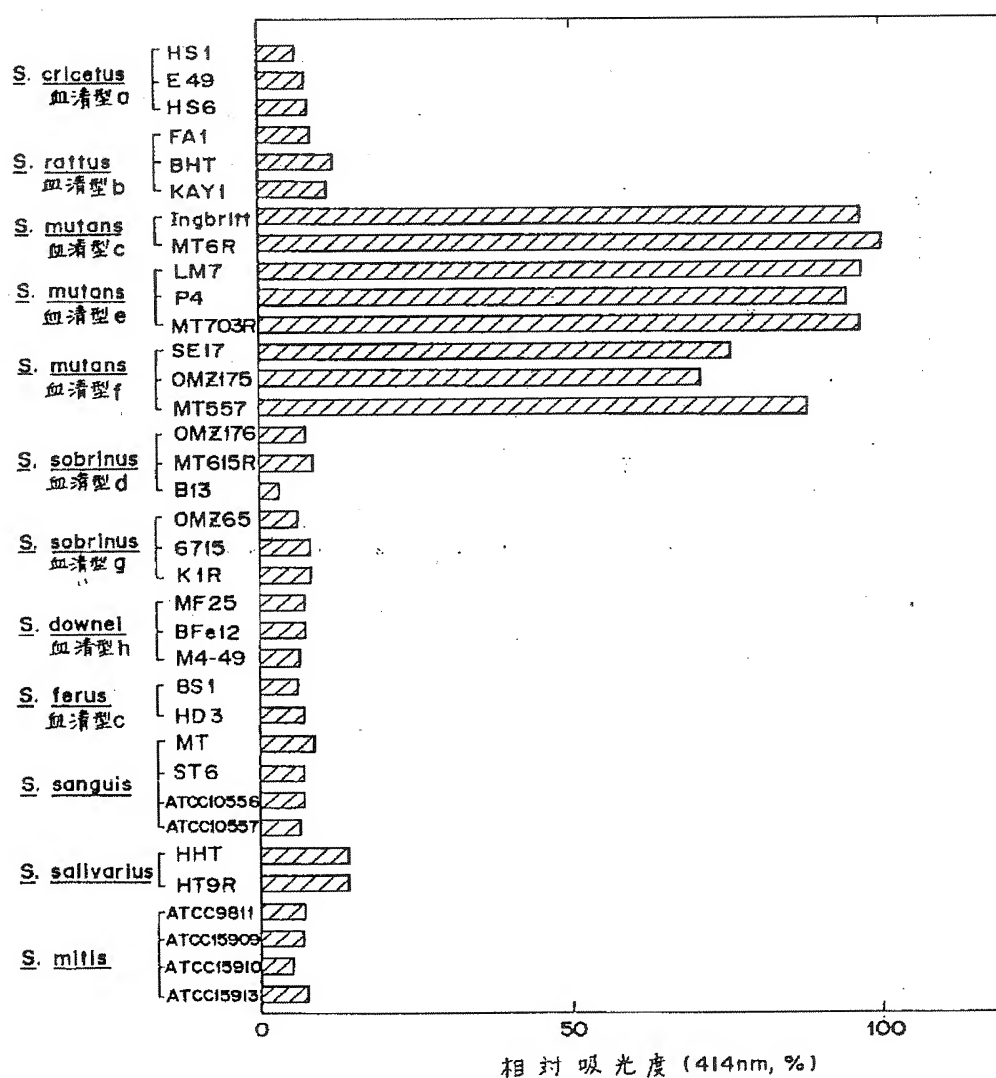
第1図は、モノクローナル抗体MAb「89」と種々の菌株との反応性を調べた結果を示すグラフであり、第2図は、ハイブリドーマ「89」をマウス腹腔内に投与して得た腹水液、ハイブリドーマ「89」の培養上清、およびそれを10倍濃縮したものについて、抗体価を測定した結果を示すグラフである。

特許出願人 長瀬産業株式会社

代理人 弁理士 青山 葆 外1名

第 1 図

MAb189菌種特異性(EIA法)



第 2 図

数種の抗体試料の抗体価測定(EIA法)

